

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-320693

(43) 公開日 平成4年(1992)11月11日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/00	B	8214-4B		
C 0 7 K 3/20		7731-4H		
		7731-4H		
C 1 2 P 21/00	C	8214-4B		
		8828-4B		
			C 1 2 N 15/00	A
			審査請求 未請求 請求項の数 1 (全 7 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-88764

(22) 出願日 平成3年(1991)4月18日

(71) 出願人 000003182

徳山曹達株式会社

山口県徳山市御影町1番1号

(72) 発明者 菊池 匡芳

山口県徳山市御影町1番1号 徳山曹達株式会社内

(72) 発明者 吉村 佳典

山口県徳山市御影町1番1号 徳山曹達株式会社内

(72) 発明者 岡田 昌人

山口県徳山市御影町1番1号 徳山曹達株式会社内

(54) 【発明の名称】 タンパクの精製方法

(57) 【要約】

【構成】 大腸菌によって産生されたヒトC型肝炎ウィルスコア抗原タンパクまたはそのコア抗原領域を含むタンパクを2-メルカプトエタノール及びグアニジン塩酸を含有する緩衝液で抽出した後、グアニジン塩酸を含有する緩衝液存在下でゲル濾過クロマトグラフィーを行って分取することを特徴とするタンパクの精製方法。

【効果】 コア抗原タンパクまたはコア抗原領域を含むタンパクを、まず高効率で且つ大腸菌内のプロテアーゼによる分解を受けずに高効率で抽出でき、更に抽出液を何んら処理することなくそのままクロマトグラフィーによる精製の妨害成分となる不純タンパクや核酸を効果的に除去できる。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 大腸菌によって産生されたヒトC型肝炎ウイルスコア抗原タンパクまたはそのコア抗原領域を含むタンパクを2-メルカプトエタノール及びグアニジン塩酸を含有する緩衝液で抽出した後、グアニジン塩酸を含有する緩衝液存在下でゲル濾過クロマトグラフィーを行って分取することを特徴とするタンパクの精製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、大腸菌によって産生されたヒトC型肝炎ウイルスコア抗原タンパクまたはそのコア抗原領域を含むタンパクの精製法に関する。

【0002】

【従来の技術】 ヒトC型肝炎は、ヒトC型肝炎ウイルスによって引き起こされる肝炎であり、輸血後の非A非B型肝炎のほとんどは、この肝炎であると言われている。

【0003】 そして、その多くは更に肝ガンへと病状が進行する。ヒトC型肝炎ウイルスは、遺伝子の長さ約10Kb (約1万ヌクレオチド) のRNAウイルスとされ、フラビウイルスとの類似性から5'末端から約1.5Kbの部分で構造タンパク遺伝子部分に相当し、残りが非構造タンパク遺伝子部分に相当すると考えられている。又、約1.5Kbの構造タンパク遺伝子部分は、コア抗原遺伝子部分、膜タンパク遺伝子部分、外皮タンパク遺伝子部分に機能的に分かれているものと考えられている。

【0004】 C型肝炎ウイルスの遺伝子の非構造タンパク遺伝子領域および構造タンパク遺伝子領域について、前者は、カイロン社によるヨーロッパ特許 (EP0318216) での報告があり、後者は、カイロン社によるヨーロッパ特許 (EP0388232) での報告および下遠野らの平成2年7月3日日本ガン学会における口頭発表による報告等がある。

【0005】 その後の国内外の研究により、ヒトC型肝炎ウイルス遺伝子の構造タンパク遺伝子領域のうちのコア抗原遺伝子部分でコードされるタンパク (コア抗原) は、その他の抗原性を有する領域 (C-100抗原等) よりも抗原性が強く、特異性も高く、且つヒトC型肝炎ウイルス感染の初期診断が可能であるタンパクであることが明らかにされた。 (Muraisho, K, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 172, (2), 511-16 (1990)) 近年輸血後非A非B型肝炎患者の血液中に存在する抗体を検出する診断薬に使用できるタンパク試料として、又、ヒトC型肝炎ウイルスに関する分子生物学的、免疫学的研究に使用できるタンパク試料として、高度に純化したタンパク試料の供給が強く望まれている。そのためには、ヒトC型肝炎ウイルスコア抗原領域を含むタンパクを大腸菌および酵母等で大量産生させる製造方法、産生された該タンパクを産生細胞から抽出する方法、および、得られた抽出物から該タンパクを純化する精製方法とを確立することが必要である。

【0006】 大腸菌で産生されたヒトC型肝炎ウイルスのコア抗原タンパクまたはその抗原領域を含むタンパクを大腸菌から抽出する方法および抽出物から該タンパクを純化する精製方法については現在まで報告がないが、大腸菌で産生されたタンパクを抽出し、精製した他のタンパクの例は数多くなされている。

【0007】 大腸菌で産生された可溶性タンパクは、一般に菌を集菌後、変性剤および界面活性剤を含んでいない通常の緩衝液でタンパクを抽出し、続いて、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿 (分画) 等の精製手段を用いて精製できる。又、大腸菌で産生された不溶性又は難溶性タンパクの精製法としては、菌を集菌後、内容物を変性剤又は界面活性剤を含んだ緩衝液で抽出した後、該抽出物に対して、SPS-ポリアクリルアミド電気泳動を行ない、目的のタンパク部分のゲルを切り出しゲルから電気泳動的にタンパクを抽出する方法、および菌を集菌後、変性剤又は界面活性剤を含んだ緩衝液で内容物を抽出し、同緩衝液存在下で、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーを行なった例が報告されている。

【0008】 具体例としては、組換えレニンタンパクを大腸菌で産生させ、集菌し、変性剤を含んでいない緩衝液に懸濁させ、リゾチーム処理、超音波処理、低速遠心分離による沈殿を行なった後、該沈殿物を6Mグアニジン塩酸を含有した緩衝液で可溶化し、同緩衝液存在下でゲル濾過して、95%以上の純度をもつ組換えレニンタンパクを精製した例 (Imai, T., et al., J. Biochem., 100, 425 (1986)) 等が挙げられる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは、大腸菌で産生されるヒトC型肝炎ウイルスのコア抗原タンパク又はそのコア抗原領域を含むタンパク (以下、C-タンパクと略す。) の抽出方法及び精製方法について検討した。その結果、C-タンパクは該タンパクのコア抗原領域の性質に起因して水に難溶性であり、変性剤非存在下あるいは界面活性剤非存在下では該タンパクを効率よく抽出できないことを見出した。

【0010】 又、上記の方法で得られた抽出物に対して変性剤非存在下、又は、界面活性剤非存在下でのイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等の精製手段を用いて精製を進めても大腸菌内のその他の不純タンパクおよび核酸等と凝集するために有効に精製できないことがわかった。そして、界面活性剤存在下でのC-タンパクの抽出では、抽出はできるものの、該抽出物を使用すると、後に続く精製工程を進めることが容易でないことがわかった。

【0011】 さらに、C-タンパクの変性剤存在下での抽出を検討した結果、尿素存在下で大腸菌で産生されるC-タンパクを抽出すると抽出中にC-タンパクが大腸

菌内のプロテアーゼにより分解されることがわかった。

【0012】又、展開緩衝液中に尿素を含有させて、該タンパク生産菌の抽出液に対して、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーを行なったところ、上記の変性剤非存在下の場合と同様に、C-タンパクと大腸菌内のその他の不純タンパクおよび核酸等と凝集するために、C-タンパクとクロマトグラフィーを妨害する成分との分離ができず、得られたC-タンパク画分に対して、さらなる精製手段を加えても、有効に精製できないこともわかった。

【0013】C-タンパク精製法として、従来技術で紹介したSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を使用した精製法を適用した場合、ある程度精製できるものの、産生したC-タンパクと分子量の近い大腸菌由来の不純タンパクも精製タンパク試料に含まれてしまうこと、工業的な大量精製法として適当でないこと等の問題点がわかった。

【0014】さらに、従来技術で紹介した組換えレニンタンパクの抽出及び精製法は、ゲル濾過クロマトグラフィーを行なう前に、該タンパク抽出物に対して煩雑な前処理を行わなければならない、工業的な大量精製法という点で不適である。

【0015】本発明者らは、大腸菌で産生されたC-タンパクをいかなる変性剤を含んだ緩衝液で大腸菌から抽出すれば効率よく且つ、C-タンパクが大腸菌内のプロテアーゼに分解されずに済むか、そして更に抽出物からC-タンパクを精製するために、クロマトグラフィーを妨害する成分を除去するのにいかなる精製手段で行なえばよいか、又、その精製手段が操作的に簡便で、工業的な大量精製法に適しているかどうか等について、数多くの研究を行なった。鋭意研究の結果、大腸菌によって産生されたC-タンパクを2-メルカプトエタノール及びグアニジン塩酸を含有する緩衝液で抽出した後、グアニジン塩酸を含有する緩衝液存在下で、ゲル濾過クロマトグラフィーを行ない、C-タンパク画分を分取することで、かかる目的を達成し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明は、大腸菌によって産生されたヒトC型肝炎ウイルスコア抗原タンパクまたはそのコア抗原その領域を含むタンパクを2-メルカプトエタノール及びグアニジン塩酸を含有する緩衝液で抽出した後、グアニジン塩酸を含有する緩衝液存在下でゲル濾過クロマトグラフィーを行って分取することを特徴とするタンパクの精製方法である。

【0017】本発明においてヒトC型肝炎ウイルスコア抗原タンパクとは、ヒトC型肝炎ウイルス遺伝子の構造タンパク遺伝子領域のうちコア抗原遺伝子部分でコードされるタンパクであり、少なくともヒトC型肝炎ウイルス遺伝子の開始コドンの最初の塩基（アデニン）から始

まる360個の塩基がコードするタンパクを指す。例えば開始コドンから始まる482塩基のDNA塩基配列がコードする161個のアミノ酸をヒトC型肝炎ウイルス由来タンパクとして含むタンパクが例示される。

【0018】本発明のタンパクは、上記コア抗原遺伝子部分でコードされるタンパクの端部が不可避免的に切断された場合、或いは付加的に例えばベクター由来のペプチドが連結されている場合も含む。

【0019】本発明において使用されるC-タンパクを産生するための大腸菌は、特に制限されるものではない。大腸菌でのC-タンパクの産生方法は、ヒトC型肝炎ウイルスコア抗原をコードする遺伝子は大腸菌で遺伝子発現可能なベクターに組込んで組換えベクターを得、該組換えベクターで大腸菌を形質転換された大腸菌を使用して、C-タンパクを産生する方法である。ヒトC型肝炎ウイルスのコア抗原領域を含むタンパクを大腸菌で産生させる方法の具体例としては、ヒトC型肝炎ウイルスコア抗原をコードする遺伝子断片をベクターpET-3dに挿入して得た組換えベクターpKMR3を用いて、大腸菌BL21(DE3)を形質転換させ、該形質転換体をラクトースを含まない栄養培養で培養後、IPTG（イソプロピルチオガラクトシド）を添加して、引き続き培養することで産生させる方法（Muraiko, K. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 172(2), 511-16(1990)）が挙げられる。

【0020】上記の方法で、C-タンパクを産生させた大腸菌を遠心分離することで、大腸菌ペレットを得る。そして、該大腸菌ペレットを2-メルカプトエタノール及びグアニジン塩酸を含有する緩衝液に懸濁する。該緩衝液中に含有される2-メルカプトエタノールの濃度は、1mM～100mMの範囲であればいかなる濃度でも良いが、40mM～60mMが好適である。

【0021】又、グアニジン塩酸の濃度は、1M～8Mの範囲であればいかなる濃度でも適用できるが、5M～6Mが好適である。

【0022】又、緩衝液のpHは、5～9の範囲であればいかなるpHでも適用できるが、6～8が好適である。

【0023】該緩衝液の種類としては、上記のpHで緩衝作用を示すものであれば何んら制限されず例えば、リン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液等が好適に使用される。

【0024】又、該緩衝液の濃度は、5mM～100mMの範囲で適用できるが、10mM～50mMが好適である。

【0025】次に、細胞懸濁液に対して、ダイノミル破砕機、超音波破砕装置等を使用し、細胞の破砕を行ない、該破砕物を遠心分離し、その上清を得ることでC-タンパクと大腸菌の不純タンパク等とが混合した抽出物を得る。さらに、該抽出物を使用して、グアニジン塩酸を含有する緩衝液存在下で、ゲル濾過クロマトグラフィーを行なう。ゲル濾過クロマトグラフィーに使用する緩

衝液に含有されるグアニジン塩酸の濃度は、1 M~8 Mの範囲であればいずれの濃度でも良いが、2 M~4 Mが好適である。

【0026】該緩衝液のpHは、5~9の範囲であればいずれのpHでも適用できるが、細胞懸濁時に使用した緩衝液のpHと合わせることを望ましい。

【0027】該緩衝液の種類としては、上記のpHで緩衝作用を示すものであれば、何ら制限されず、細胞懸濁時に使用した緩衝液の種類と合わせることを望ましい。

【0028】該緩衝液の濃度は、5 mM~100 mMの範囲で適用できるが、10 mM~50 mMが好適である。

【0029】ゲル濾過クロマトグラフィーに使用できる担体としては、担体のタンパク分画範囲内にC-タンパクの分子量が入っているものであれば、特に限定されない。例えば Sephacryl S-200 HR, Sephacryl S-300 HR (pharmacia 社製) が好適である。ゲル濾過クロマトグラフィーの操作および分取方法は特に限定されず、一般の公知の方法で行なえる。分取されたフラクションを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって検定し、そのデータを元にして、C-タンパク画分を集める。

【0030】大腸菌内に存在するクロマトグラフィーを妨害する成分が除かれた上記画分に対して、更にイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等の公知の方法で精製を進めることができる。具体的に例示すれば、該画分を、尿素を含有する緩衝液に交換した後、該交換液に硫酸アンモニウムを最終濃度 0.5 M~2 M になるように添加し、溶解後、さらに該硫酸アンモニウム溶解液を、疎水性担体を充填したカラムにかけ、カラムを出発用緩衝液で洗浄後硫酸アンモニウムの逆濃度勾配で吸着画分を溶出させ、分取されたフラクションを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって検定し、その結果をもとにして、C-タンパク画分を集める疎水性クロマトグラフィーが挙げられる。

【0031】

【発明の効果】本精製方法は、大腸菌で産生されたヒトC型肝炎ウイルスコア抗原タンパクまたはそのコア抗原領域を含むタンパクを大腸菌から高収率で、且つ、大腸菌内のプロテアーゼによる分解を受けずに抽出でき、更に抽出物から緩衝液を交換することなく直接即ち、操作的に簡便で、且つ迅速に該タンパクを精製するためのクロマトグラフィーを妨害する成分を除去することができる有用な精製法である。本精製法で得られた画分は、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等の公知の方法でさらに精製を進めることが可能である。

【0032】

【実施例】以下、実施例をあげて説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1

ヒトC型肝炎ウイルスコア抗原領域を含む組換えタンパク(分子量23kd;以下、corexタンパクと略す)を産生する大腸菌HCVKMR3からのcorexタンパクの精製

プラスミドpKMR3で形質転換されたBL21(DE3)大腸菌HCVKMR3(微工研菌寄第11569号;FERM P-11569)を20リットルのM9 ZB培地(NH₄Cl 0.3%, KH₂PO₄ 0.3%, Na₂HPO₄ 0.6%, NaCl 0.5%, MgSO₄ 1mM, バクトトリプトン1%, グルコース0.1%, アンピシリン50μg/ml)で培養し、OD₆₀₀が0.4となった時点で、IPTG(イソプロピルチオガラクトシド)を最終濃度が0.4mMになるように添加し、引き続き、37℃で2時間培養することで、corexタンパクを生産させた。

【0033】その後、細胞を8000rpm、4℃で連続遠心し、ペレットを凍結することにより保存用に回収した。

【0034】湿潤重量は、20gであった。次に湿潤重量5gの凍結HCVKMR3ペレットを解凍し、ペレット1gにつき、抽出用緩衝液4mlの比率で懸濁した。

【0035】抽出用緩衝液の組成は、3Mグアニジン塩酸、40mMメルカプトエタノール、pH7.0の10mMリン酸緩衝液とした。

【0036】該懸濁物を超音波処理によりcorexタンパクを抽出し、遠心分離(15000rpm, 30min, 4℃)し、上清(19ml)を得た。

【0037】上清の全タンパク量は、1860mgであった。

【0038】次に、該上清画分19mlに対して、展開緩衝液を2Mグアニジン塩酸、pH7.0の20mMリン酸緩衝液とし、担体として、Sephacryl S-300HR(pharmacia(株)社製)を使用してゲル濾過クロマトグラフィーを行なった。

【0039】使用カラムは内径4cm、長さ150cmで担体容量は、1.8リットルであった。流速は36ml/hrで行なった。カラムからの溶出液を7ml画分毎に集め、その後、集めた各フラクションをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって検定し、その結果をもとにしてcorexタンパク画分を集めた。

【0040】該corexタンパク画分は、80ml中にたんぱく質60mgを含有していた。次に、上記corexタンパク画分に対して疎水性クロマトグラフィーを行うために、緩衝液変換を行なった。

【0041】corexタンパク画分を6M尿素を含んだ10mMリン酸緩衝液(pH7.0)2リットルに対して、2回透析することで、緩衝液変換を行なった。尚、1回の透析時間は5hrで、4℃で行なった。

【0042】続いて、該透析液に硫酸アンモニウム濃度

0.8Mになるように粉末硫酸アンモニウムを添加し、溶解した。

【0043】最後に該溶解液に対して、第二段階のクロマトグラフィーとして、疎水性クロマトグラフィーを行なった。

【0044】まず、出発用緩衝液を0.8M硫酸アンモニウム、6M尿素を含んだ10mMリン酸緩衝液(pH7.0)とし、担体としてButyl-Toyopearl(東ソー(株)社製)を使用するカラムを作製した。

【0045】上記の溶解液85mlを、作成したカラムにかけた。尚、作製したカラムは、内径1.4cm、長さ18cmで担体容量25mlのものであった。又、流速は14ml/hrで行なった。

【0046】カラムにかけた後、出発用緩衝液100mlでカラムを洗浄し、未吸着画分を溶出した。洗浄後、吸着画分を0.8M→0M硫酸アンモニウム直線勾配で溶出させた。(勾配の全容量は、300mlで行なった。)カラムからの溶出液を2ml画分毎に集め、その後、集めた各フラクションをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって検定し、その結果をもとに、corexタンパク画分を集めた。その画分は、56ml中にタンパク4mgを含有していた。

【0047】以上の精製法により、HCVKMR3 5gにつきcorexタンパク4mgを得た。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による評価では、純度95%以上であった。

【0048】図1にcorexタンパクの各精製工程での純度をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べた結果を示す。

【0049】Lane1:corexタンパクを産生しているHCVKMR3のベレットをグアニジン塩酸を含有した緩衝液で懸濁し、続いて超音波処理した処理液を遠心分離し、得た上清。

【0050】Lane2:上記処理液を遠心分離し、得た沈殿物

Lane3:Lane1の上清に対して、ゲル濾過クロマトグラフィーを行なって得られたcorexタンパク画分

Lane4:Lane3のcorexタンパク画分に対し緩衝液交換、硫酸アンモニウム添加、溶解後、疎水性クロマトグラフィーを行なって得られたcorexタンパク画分(精製タンパク試料)

比較例1

実施例1で得られた凍結HCVKMR3ベレット5gを解凍し、ベレット1gにつき抽出用緩衝液4mlの比率で懸濁した。抽出用緩衝液の組成は、pH7.0の10mMリン酸緩衝液とした。

【0051】該懸濁物を超音波処理によりcorexタンパクを抽出し、遠心分離し、上清(15ml)を得

た。上清の全タンパク量は、1100mgであった。

【0052】得られた上清(15ml)を20mMリン酸緩衝液(pH7.0)2リットルに対して、2回透析することで、緩衝液交換した。

【0053】尚、1回の透析時間は5hrで、4℃で行なった。

【0054】次に、該交換液に対して、展開用緩衝液を20mMリン酸緩衝液(pH7.0)とし、担体としてSephacryl S-300HR(pharmacia社製)を使用したゲル濾過クロマトグラフィーを行なった。

【0055】使用カラムは、内径4cm、長さ150cmで担体容量は、1.8リットルであった。流速は36ml/hrで行なった。

【0056】カラムからの溶出液を7ml画分毎に集め、その後、集めたフラクションをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって検定し、そのデータを元にして、corexタンパク画分を集めた。該corexタンパク画分は白濁しており、150ml中にタンパク質900mgを含有していた。

【0057】次に、上記corexタンパク画分に対して、疎水性クロマトグラフィーを行うために、まず最終濃度6Mになるように粉末尿素を添加、溶解した。

【0058】次に、該溶解液を6M尿素を含んだ10mMリン酸緩衝液(pH7.0)2リットルに対して、2回透析することで、緩衝液交換を行なった。尚、1回の透析時間は5hrで4℃で行なった。

【0059】続いて、該透析液に硫酸アンモニウム濃度0.8Mになるように粉末硫酸アンモニウムを添加し、溶解した。

【0060】最後に該溶解液に対して、疎水性クロマトグラフィーを行なった。まず、出発用緩衝液を0.8M硫酸アンモニウム、6M尿素を含んだ10mMリン酸緩衝液(pH7.0)とし、担体としてButyl-Toyopearl(東ソー(株)社製)を使用するカラムを作製した。上記の溶解液170mlを作製したカラムにかけた。

【0061】尚、作製したカラムは、内径1.4cm、長さ18cmで担体容量25mlのものであった。又、流速は14ml/hrで行なった。

【0062】カラムにかけた後、出発用緩衝液100mlでカラムを洗浄し未吸着画分を溶出した。

【0063】洗浄後、吸着画分を0.8→0M硫酸アンモニウム直線勾配で溶出させた。(勾配の全容量は、300mlで行なった。)カラムからの溶出液を3ml画分毎に集め、その後集めたフラクションをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって検定し、そのデータを元にcorexタンパク画分を集めた。

【0064】その画分は、100ml中にタンパク22mgを含有していた。SDS-ポリアクリルアミドゲル

電気泳動による評価では、純度約6%以下であった。

【0065】図2に、比較例1で行なったcorexタンパクの各精製工程での純度をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べた結果を示す。

【0066】Lane1: corexタンパクを産生しているHCVKMR3のペレットを2-メルカプトエタール及びグアニジン塩酸を含有しない緩衝液で懸濁、続いて超音波処理した処理液を遠心分離し、得た上清Lane2: 上記処理液を遠心分離し、得た沈殿物Lane3: Lane1の上清に対して、ゲル濾過クロマトグラフィーを行なって得られたcorexタンパク画分Lane4: Lane3のcorexタンパク画分に対し緩衝液交換硫酸アンモニウム添加、溶解後、疎水性クロマトグラフィーを行なって得られたcorexタンパク画分である。

【0067】以上の結果よりcorexタンパクを産生しているHCVKMR3のペレットを2-メルカプトエタール及びグアニジン塩酸を含有しない緩衝液を使用して抽出した場合、抽出効率が低く、抽出操作後、遠心分離した沈殿物にかなりcorexタンパクが残っている、(デンスドメトリーによる分析で、約40%程のcorexタンパクが残っていることが判った) 又、得られた上清に対して、グアニジン塩酸を含有しない展開用緩衝液存在下で、ゲル濾過クロマトグラフィーを行なつ*

表 1

緩衝液の種類	緩 衝 液 の 組 成
1	50mMトリス-塩酸緩衝液 (pH7.0)
2	10mM リン酸緩衝液 (pH7.0)
3	3M尿素を含有する緩衝液2
4	6M尿素を含有する緩衝液2
5	50mMメルカプトエタノール、6Mグアニジン塩酸を含有する緩衝液2

【0072】得られた沈殿物および上清をそれぞれ別々にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、ゲルをクーマシー染色した後、脱色した。脱色したゲルをデンスドメトリーで分析することで、電気泳動したゲル上のcorexタンパクのバンドの濃さを上清と沈殿とで比較し、上清に抽出された割合を抽出効率として求め、それぞれ表2に示した。

【0073】又、上清を電気泳動したゲル上のcore

*た場合、corexタンパクが核酸および他の不純タンパクと凝集するため、効果的に精製されず、上記ゲル濾過クロマトグラフィーのcorexタンパク画分に対して、実施例1と同様な疎水性クロマトグラフィーを行なっても、得られたcorexタンパク画分の該タンパクの純度は悪いものになっていることがわかった。

【0068】実施例1と比較例1の比較から、本発明によりcorexタンパクが該タンパクを産生しているHCVKMR3から高収率で抽出され、該抽出物に対して、本法の方法で精製することで、該タンパクと大腸菌内の核酸および他の不純タンパクとの凝集が阻止される。

【0069】又、本法によって得られたcorexタンパク画分は、公知の一般的な方法でさらに精製できることが判明した。

【0070】比較例2

実施例1で得られた凍結HCVKMR3ペレットを解凍し、ペレット1gにつき、表1に示す組成の各々の緩衝液4mlの割合でそれぞれ懸濁し、該懸濁物を超音波処理後遠心分離(15000rpm, 4℃, 30min)し、上清4mlと沈殿物を得た。

【0071】

【表1】

xタンパクのバンドの濃さを表1の1~5の緩衝液間で比較した。表1の緩衝液5を使用して得られた上清のcorexタンパクのバンドの濃さを100%とし、表1の緩衝液1~4を用いて、抽出して得られた上清のcorexタンパクのバンドの濃さをcorexタンパク相対量として表わした。(表2)

【0074】

【表2】

(7)

(7)

特開平4-320693

11

12

表 2

緩衝液の種類 *	抽出効率 (%)	corexタンパク相対量 (%)
1	50	50
2	60	60
3	100	30
4	100	60
5	100	100

*緩衝液の種類は、表1に準ずる。

【0075】表1の1、2で示されている変性剤を含有しない緩衝液を使用した場合、表2に示す通り、抽出効率が低い。

【0076】又、表1の緩衝液3、緩衝液4を使用した場合、抽出効率は100%であるが、緩衝液5で抽出した時のcorexタンパク量を100%とした場合、corexタンパク相対量はそれぞれ30%、60%と少ない。

【0077】これは、抽出操作時に大腸菌内のプロテア

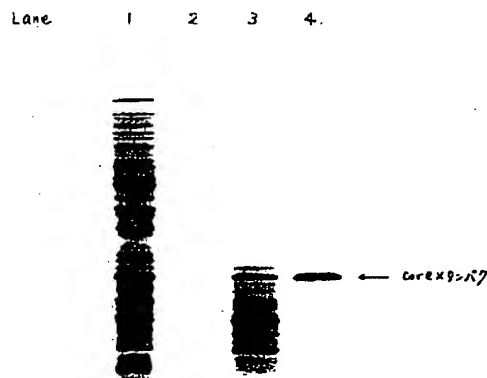
ーゼによりcorexタンパクが分解されていることが原因と考えられる。

【図面の簡単な説明】

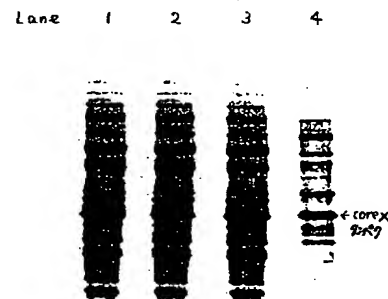
【図1】実施例1のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べたcorexタンパクの各精製工程での純度を示す図である。

【図2】比較例1のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べたcorexタンパクの各精製工程での純度を示す図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// C 1 2 N 15/51

(C 1 2 P 21/00

C 1 2 R 1:19)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

no EP or US
equiv.

(11)Publication number : 04-320693

(43)Date of publication of application : 11.11.1992

(51)Int.Cl.

C12P 21/00
C07K 3/20
C07K 3/26
// C12N 15/51
(C12P 21/00
C12R 1:19)

(21)Application number : 03-086764

(71)Applicant : TOKUYAMA SODA CO LTD

(22)Date of filing : 18.04.1991

(72)Inventor : KIKUCHI MASAYOSHI
YOSHIMURA YOSHINORI
OKADA MASATO

METHOD FOR PURIFYING PROTEIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To purify a protein such as a diagnostic agent for hepatitis C, etc., without decomposing microbial cell protease by extracting a human hepatitis C virus core antigenic protein produced by Escherichia coli with a specific buffer solution and then carrying out gel filtration thereof with a specified buffer solution.

CONSTITUTION: Escherichia coli HCVKMR3 (FERM P-11569) transformed by inserting a plasmid pKMR3 containing a gene capable of coding a human hepatitis C virus core antigenic protein or a protein containing its core antigenic region is cultured in a culture medium at 37° C for 2hr to centrifuge the culture solution. Microbial cells are then collected and pelletized. The resultant pellets are subsequently suspended in a buffer solution containing 2-mercaptoethanol and guanidine hydrochloride and subjected to ultrasonic treatment to extract the produced protein. The obtained extract solution is then centrifuged, subjected to gel filtration chromatography in the presence of a buffer solution containing the guanidine hydrochloride and purified. Thereby, the human hepatitis C virus core antigenic protein or the protein containing its core antigenic region is purified.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.